

**Identifizierung von Desoxyzuckern im
Lipopolysaccharid von *Yersinia enterocolitica*-
Stämmen der O-Gruppen I und VI**

von
Ingrid Margarete Heinz
aus
Nürnberg

1976 № 394



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546220_0039

Aus dem Institut für Klinische Mikrobiologie und
Infektionshygiene der Universität Erlangen - Nürnberg

Vorstand: Prof. Dr. med. W. Knapp

Identifizierung von Desoxyzuckern im Lipopolysaccharid von *Yersinia enterocolitica*- Stämmen der O-Gruppen I und VI

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
dem Fachbereich Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

vorgelegt

von

Ingrid Margarete Heinz

aus

Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin
der Universität Erlangen - Nürnberg



Dekan : Prof. Dr. med. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. med. W. Knapp

Tag der mündlichen Prüfung : 09. August 1976

Herrn Prof. Dr. med. W.Knapp danke ich für die freundliche Überlassung des Themas.

Ebenso danke ich Herrn Diplomchemiker Dr.K.Wartenberg für alle Ratschläge und Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
<u>Zusammenfassung</u>	1
A) <u>Allgemeiner Teil</u>	
I) Einleitung	3
II) Kulturell-biochemische und serologische Eigenschaften von <i>Yersinia enterocolitica</i>	3
III) Lipopolysaccharide als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Stäbchenbakterien innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae	4
1) Aufbau der Bakterienzellwand und Nachweis der Lipopolysaccharide	4
2) Chemischer Aufbau der Lipopolysaccharide von Glattformen und ihre Zuckerbestandteile	5
3) Chemischer Aufbau der Lipopolysaccharide von Rauhformen und ihre Zuckerbestandteile	7
4) Zuckerbestandteile als Grundlage der serologischen Spezifität	8
IV) Zusammensetzung der Lipopolysaccharide bestimmter <i>Yersinia enterocolitica</i> -Stämme verschiedener O-Gruppen	9
V) Papier- und dünnschichtchromatographische Charakterisierung von 6-Desoxyhexosen	11
B) <u>Experimenteller Teil</u>	
I) Material und Methoden	15
1) Bakterienstämme	15
2) Gewinnung der Lipopolysaccharide	15
3) Hydrolyse der Lipopolysaccharide	16
4) Präparative Isolierung der 6-Desoxyzucker	16
5) Analysenmethoden	18
II) Identifizierung des Desoxyzuckers verschiedener Stämme der O-Gruppe I (Ye 62, Ye 160, Ye 75, Ye 39)	21
1) Papier- und gaschromatographische Vergleiche der Lipopolysaccharid-Vollhydrolysate	21
2) Papierchromatogramm der Stufenhydrolysate	27
3) Massenspektrogramme	28

	Seite
4) Gas- und Papierchromatogramme zum Ausschluß von Rhamnose und Fucose	30
5) Papier- und dünn-schichtchromatographische Bestimmung der Laufstrecke des isolierten Desoxyzuckers	38
6) Messung des Drehwinkels	38
III) Identifizierung des Desoxyzuckers von Stamm Ye 161(O-Gruppe VI)	39
1) Gaschromatogramm des Vollhydrolysats	39
2) Papierchromatogramm der Stufenhydrolysate	41
3) Massenspektrogramm	42
4) Gas- und Papierchromatogramme zum Ausschluß von Rhamnose und Fucose	44
5) Elektrophorese	48
6) Papier- und dünn-schichtchromatographischer Vergleich der Laufstrecken des aus Stamm Ye 161 isolierten Desoxyzuckers	48
7) Messung des Drehwinkels	49
C) <u>Diskussion</u>	50
Literaturverzeichnis	51

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zuckerzusammensetzung der Lipopolysaccharide (LPS) von 5 *Yersinia enterocolitica*-Stämmen untersucht. Je 2 Stämme gehören nach dem Antigen-schema von Knapp und Thal (11) zur O-Gruppe IA (Ye 75, Ye 160) bzw. IB (Ye 39, Ye 62) und 1 Stamm zur O-Gruppe VI (Ye 161). Es gelang uns nachzuweisen, daß die LPS der 4 Stämme der O-Gruppe I außer Rhamnose eine zweite 6-Desoxyhexose enthalten. Mit Hilfe der Gas- und Papierchromatographie konnten wir ausschließen, daß es sich dabei um Rhamnose oder Fucose handelt. Durch dünnschicht- und papierchromatographische Untersuchungen und Messung des optischen Drehwinkels ließ sich der Desoxyzucker der O-Gruppe I als 6-Desoxy-L-altrose identifizieren.

Analoge Untersuchungen an dem zur O-Gruppe VI gehörenden *Yersinia enterocolitica*-Stamm Ye 161 ließen erkennen, daß sein LPS die Desoxyzucker Fucose und 6-Desoxy-L-glucose enthält. Letztere wurde unseres Wissens bisher noch nicht als LPS-Bestandteil gramnegativer Bakterien gefunden. Möglicherweise handelt es sich um einen für Stämme von *Yersinia enterocolitica* der O-Gruppe VI spezifischen Zucker.

A) A L L G E M E I N E R T E I L

I Einleitung

Der Gattung "Yersinia" innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae werden gramnegative, bei 37°C unbewegliche Bakterien in ovoider oder Stäbchenform zugeordnet. Ihre charakteristischen kulturell-biochemischen Eigenschaften lassen innerhalb der Gattung die drei Species *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* unterscheiden (1). Die in den letzten Jahren im In- und Ausland rasch an Zahl zunehmenden Publikationen über Infektionen mit *Yersinia enterocolitica* (Y.ent.) weisen auf ihre humanmedizinische Bedeutung hin. Die Infektionen äußern sich beim Menschen hauptsächlich unter den Symptomen einer akuten, seltener subakuten bis chronischen Enteritis, einer Appendicitis mit dem bioptischen Bild einer mesenterialen Lymphadenitis oder akuten Ileitis terminalis und selten einer z.T. tödlich verlaufenden Sepsis. Als Begleiterscheinungen oder Folgen können bei allen Verlaufsformen Erythema nodosum oder Arthralgien bzw. Arthritiden auftreten (9).

II Kulturell-biochemische und serologische Eigenschaften von *Yersinia enterocolitica*

Publikationen verschiedener Autoren führten dazu, daß in die Species Y.ent. Stämme mit sehr verschiedenen kulturell-biochemischen Eigenschaften aufgenommen und diese entsprechend ihres unterschiedlichen fermentativen oder oxydativen Verhaltens in 5 bzw. 6 Biotypen eingeteilt wurden (15,21). Diese Einteilung, die zur Aufstellung verschiedener Antigenschemata mit schließlich 34 verschiedenen O-Faktoren führte (22,27), fand keine allgemeine Anerkennung. Nach Untersuchungen von Knapp und Thal (11) sind der Species Y.ent. nur solche Stämme zuzuordnen, die in ihren Stoffwechseleigenschaften mit den charakteristischen kulturell-biochemischen Eigenschaften von "Pasteurella X" und einer indol-positiven Variante übereinstimmen. Als Referenzstämme wurden die Stämme Ye 39, Ye 62, Ye 160, Ye 373 und Ye 161 benannt (10).

Ein vereinfachtes Antigenschema führte zur Unterscheidung der wie folgt zusammengestellten O-Gruppen I-VI mit den O-Faktoren 1-8 und den Subgruppen IA und IB.

O-Gruppe	O-Faktoren nach Knapp und Thal(11)	Teststämmen Ye	O-Faktoren nach Winblad(27) / Wauters(21)
I			
IA	(1) 2	75	3
IB	(1) 2,3	62	2,3
II	(1) 4	614	./.
III	(1) 5	96	4
IV	(1) 6	97	5
V	(1) 7	373	9
VI	(1) 8	161	8

Die Unterschiede in den kulturell-biochemischen Eigenschaften dieser Stämme sind der Arbeit von Knapp und Thal (11) zu entnehmen. In diesem Rahmen sei nur darauf hingewiesen, daß die Stämme der O-Gruppen I und II indol-negativ sind, während die Stämme der O-Gruppen V und VI innerhalb 48 Stunden und die der O-Gruppen III und IV erst nach Tagen - d.h. verzögert - Indol bilden.

III Lipopolysaccharide als Bestandteil der Zellwand gramnegativer Stäbchenbakterien innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae

1. Aufbau der Bakterienzellwand und Nachweis der Lipopolysaccharide (LPS)

Die Zellwand gramnegativer Bakterien besteht aus hochmolekularen Protein-Lipopolysaccharid-Komplexen, wobei die Polysaccharide für die typenspezifische Antigenwirkung verantwortlich sind. Am besten untersucht sind bisher Stämme verschiedener Species der Gattungen Salmonella, Shigella und Escherichia (3,18). Als Beispiel werden

einige Untersuchungsergebnisse bei Salmonellen in Glatt- und Rauhform detaillierter besprochen.

2. Chemischer Aufbau der Lipopolysaccharide von Glattformen und ihre Zuckerbestandteile

Zahlreiche Untersuchungen an gramnegativen Stäbchenbakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae (25) haben gezeigt, daß die LPS aus 3 Bestandteilen aufgebaut sind:

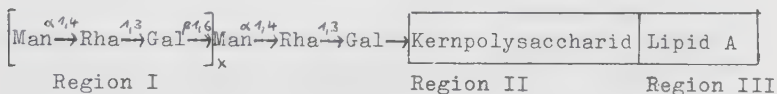
- Region I : O-spezifische Kette = Seitenkette
mit spezifischen Zuckern
- Region II : Kernpolysaccharid = Hauptkette
oder Core mit basalen Zuckern
- Region III : Lipid A

Lipid A, das in allen Lipopolysacchariden zu finden ist, stellt einmal die Verbindung zum Protein der Bakterien her, zum andern ist es an das Kernpolysaccharid geknüpft. In nahe verwandten LPS, z.B. denen aus Salmonellen, ist die Struktur des Kernpolysaccharids identisch oder ähnlich. Zucker, die häufig im Core vorkommen, sind: Hexosamine, Heptosen, Glucose, Galactose und 2-Oxo-3-desoxyoctonsäure (KDO). Weitere Zucker und ihre Abkürzungen sind wie folgt zusammengefaßt:

Glc	= Glucose
Gal	= Galactose
Man	= Mannose
Fuc	= Fucose
Rha	= Rhamnose
6-DO-Alt	= 6-Desoxy-altrose
6-DO-Glc	= 6-Desoxy-glucose
Hep I	= L-Glycero-D-mannoheptose
Hep II	= D-Glycero-D-mannoheptose
GlcN	= Glucosamin
GalN	= Galactosamin
6-DH	= 6-Desoxyhexose
3,6-DDH	= 3,6-Didesoxyhexose

An die Region II sind die O-spezifischen Ketten gebunden. Sie bilden die Seitenketten der stark verzweigt gebauten Moleküle. Durch sie werden die LPS verschiedener Species voneinander differenziert und die Aufstellung von Chemotypen möglich. Aufgebaut sind die Seitenketten aus einer Folge sich wiederholender, gleicher Oligosaccharideinheiten, den "repeating units" (12).

Beispiel: LPS von *S. newington*



Die Zusammensetzung der Region I, die Sequenz der Zucker in der Kette, sowie die Art ihrer Bindungen sind spezifisch für jedes Lipopolysaccharid. Die Seitenkette ist Träger der serologischen Spezifität, sie bedingt die enge Korrelation, die zwischen den Serotypen und den Chemotypen besteht.

Bei der Bausteinanalyse der Salmonella-Polysaccharide wurde eine neue Klasse von Desoxyzuckern, die 3,6-Didesoxyhexosen, gefunden (26). Man fand, daß diese Zucker häufig auftreten, in den O-spezifischen Ketten gebunden und charakteristisch für bestimmte Serogruppen sind. Als Beispiele sind die Paratose bei Salmonellastämmen der O-Gruppe H, Abequose bei Stämmen der O-Gruppe B und Tyvelose bei Stämmen der O-Gruppen D und B zu nennen.

Eine Analyse des zeitlichen Verlaufs der Hydrolyse von LPS mit einer 3,6-DDH ergab, daß die Didesoxyhexosen sehr rasch und vor allen anderen Zuckern freigesetzt werden. Diese Feststellung führte zu dem Schluß, daß diese Zucker endständig in den betreffenden Polysacchariden gebunden sind.

Als Beweis für die immunologisch determinante Funktion der 3,6-DDH wurden mit Colitose als determinantem Zucker künstlich Antigene hergestellt. Die Immunisierung von Kaninchen führte zur Bildung von Antikörpern gegen Colitose

und verschiedene pathogene oder potentiell pathogene Bakterienarten, die in der Zellwand colitosehaltige Polysaccharide bilden, wie z.B. der säuglingspathogene E.coli 0111 (14).

Insgesamt wurden bisher etwa 30 verschiedene Zucker gefunden, die am Aufbau der Polysaccharide gramnegativer Bakterien beteiligt sein können. Die wichtigsten sind wie folgt zusammengefaßt:

KDO	
Hexosamine	: GlcN, GalN
Heptosen	: L-Glycero-D-mannoheptose D-Glycero-D-mannoheptose
Hexosen	: Glc, Gal, Man
Pentosen	: Xylose
6-DH	: Fuc, Rha
3,6-DDH	: Abequose, Paratose, Tyvelose, Colitose

3. Chemischer Aufbau der Lipopolysaccharide von Rauhformen und ihre Zuckerbestandteile

Die Glattstämme (S-Form) der Bakterienarten, die Haupt- und Seitenketten, wie oben beschrieben, synthetisieren, bilden auf Agar-Nährböden Kolonien mit glatter, spiegelnder Oberfläche. Bei einem Formenwandel von Glatt-zur Rauhform, als Folge einer Rauh-Mutation, entstehen Kolonien mit rauher, stumpfer Oberfläche (R-Formen). Auch die R-Mutanten synthetisieren LPS. Ihre Zuckerzusammensetzung unterscheidet sich von den Glattformen charakteristisch durch ein Fehlen aller O-spezifischen Zucker. Man findet bei ihnen im Gegensatz zu den S-Formen nur einen Teil oder alle der basalen Zucker. Je nachdem, an welcher Stelle die Synthese der Kette gestoppt wird, unterscheidet man Ra bis Re-Mutanten, wie die Untersuchungen an R-Mutanten von S. minnesota zeigen. Bei den Ra-Mutanten unterbleibt lediglich die Synthese der O-spezifischen Seitenkette. Rb bis Re-Mutanten bilden unvollständige Kernpolysaccharide (12).

Beispiel: R-Mutanten von *S. minnesota*

	Lipid	A	KDO	Hep	Glc	Gal	GlcN	GalN
S-Form	+	+	+	+	+	+	+	+
Ra	+	+	+	+	+	+		
Rb	+	+	+	+	+			
Rc	+	+	+	+				
Rd	+	+	+					
Re	+	+						

4. Zuckerbestandteile als Grundlage ihrer serologischen Spezifität

Die vielen zum Genus *Salmonella* gehörenden Species wurden aufgrund der serologischen Eigenschaften ihrer Glatzformen im Kaufmann-White-Schema gruppiert (7). Dabei wurden *Salmonellen* mit identischen Körper- oder O-Antigenen jeweils in einer O-Gruppe (z.B. A-Z) zusammengefaßt. Träger der Spezifität der O-Antigene sind die immunologisch determinanten Gruppen, wobei die einzelnen O-Faktoren innerhalb einer O-Gruppe mit arabischen Zahlen wie z.B. 1,2,3 usw. bezeichnet sind. Lüderitz und Mit. (13) versuchten, eine Korrelation herzustellen zwischen der serologischen Gruppierung der *Salmonellen* und der Zuckerzusammensetzung ihrer Oberflächenantigene, die als LPS erkannt worden waren. Ihre Versuche ergaben, daß die qualitative Zuckerzusammensetzung von O-Antigenen der gleichen Serogruppe (A,B,C₁,C₂ usw.) stets gleich ist. Dem Schema der Serotypen konnte damit ein wohl begrenztes Schema entsprechender Chemotypen gegenübergestellt werden. Bei *Salmonellen* fanden Lüderitz und Mitarbeiter 16 verschiedene Chemotypen (13). Ihre Einteilung in Chemotypen ist weniger differenziert als die in Serotypen, weil die O-Antigene einiger *Salmonella*-Gruppen qualitativ die gleiche Zuckerzusammensetzung zeigen. Unterschiede werden in der Verknüpfung der Zucker serologisch determinanter Gruppen gesehen.

IV Zusammensetzung der Lipopolysaccharide bestimmter Yersinia enterocolitica-Stämme verschiedener O-Gruppen

Über die LPS-Zusammensetzung bei Y.ent. liegen bisher nur wenige Publikationen vor. Offen ist auch noch die Frage, inwieweit sich Stämme der verschiedenen Serotypen mit z.T. unterschiedlichen kulturell-biochemischen Eigenschaften in ihrer Zuckerzusammensetzung unterscheiden.

Hurvell und Lindberg (6) haben die LPS von Y.ent.-Stämmen des Serotyp 9 (Stämme der O-Gruppe V nach Knapp und Thal) gaschromatographisch untersucht und dabei die Zuckerbestandteile KDO, Heptose, Glucose und Galactose festgestellt. Mannose wurde in den LPS dieser Gruppe nicht gefunden. 1974 haben Beer und Seltmann 13 Stämme der verschiedenen O-Gruppen von Y.ent. untersucht (2). Ein Teil ihrer Ergebnisse ist wie folgt zusammengefaßt:

Tabelle 1

Lipopolysaccharid-Zusammensetzung verschiedener Y.ent.-Stämme (nach Beer und Seltmann)

O-Gr. (11)	KDO	Hep I	Hep II	Hex- amin	Glc	Gal	Man	Fuc	6-DH	Rha	X ¹⁾
IB	6 ²⁾	6	1	11	6	1	-	-	8	-	-
IA	8	5	1	8	7	1	-	-	21	-	-
III	9	4	1	8	7	1	-	-	-	10	-
IV	4	5	1	9	7	1	-	-	-	21	-
V	9	5	2	8	18	2	-	-	-	-	-
VI	8	9	-	14	6	6	3	2	-	-	3

1) X = unbekannter Zucker

2) Zahlenangaben in Gewichtsprozent

Für die Zuckerzusammensetzung bei Keimen der O-Gruppe V konnten Beer und Seltmann das Ergebnis von Hurvell (6) weitgehend bestätigen. In Hexosamin fanden sie einen zusätzlichen Bestandteil des LPS dieser Gruppe. Als gruppenspezifisch für die O-Subgruppen IA und IB nahmen sie einen 6-Desoxyzucker an, der wahrscheinlich mit der 6-Des-

oxy-altrose identisch ist, die Ellwood und Kirk (4) in einem vom Menschen isolierten, in seinen kulturell-biochemischen und serologischen Eigenschaften nicht näher beschriebenen Stamm gefunden haben. Für die O-Gruppen III und IV wurden Rhamnose und für die O-Gruppe V Glucose als spezifische Zucker angegeben. In dem Polysaccharid von Keimen der O-Gruppe VI fanden sie einen neuen, nicht näher identifizierten Zucker "X". Spätere Untersuchungen von Wartenberg, Lysy und Knapp (20) erfassten 14 Stämme der O-Gruppen I-VI von Y.ent. Die Zuckerbestandteile der LPS wurden mit Hilfe von Papierchromatographie, Gaschromatographie und Massenspektrometrie identifiziert. Das Ergebnis ihrer Untersuchungen ist nachstehend zusammengefaßt:

Tabelle.2

Lipopolysaccharid-Zusammensetzung von Y.ent.-Stämmen
(nach Wartenberg u.Mit.)

Stamm	Sero- gr.	GalN	GlcN	KDO %	Hep I	Hep II	Glc	Gal	Man	Rha	Fuc	6- DH ₁	6- DH ₂
Ye 75	IA	+	+	3,0	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Ye 62	IB	+	+	1,8	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Ye 39	IB	-	+	1,1	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Ye 614	II	+	+	3,7	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Ye 96	III	+	+	1,0	+	+	+	-	-	-	-	-	+
Ye 97	IV	+	+	1,7	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Ye 373	V	+	+	1,7	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Ye 161	VI	+	+	2,4	+	+	+	+	+	-	+	+	-

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Beer und Seltmann (2) wurden in allen Stämmen beide Heptosen, Glucose und mit Ausnahme von Stamm Ye 96 auch Galactose gefunden. Ebenfalls bestätigt wurde das Vorkommen von Mannose und Fucose im LPS des Stammes Ye 161 O-Gruppe VI. Außerdem fanden die Autoren Rhamnose im LPS der Stämme der O-Gruppen I und II. Als einen zusätzlich in Gruppe I und III auftretenden Desoxyzucker vermuteten sie wie Beer und Seltmann die von

Ellwood und Kirk (4) gefundene 6-Desoxy-altrose. Die Konfiguration des unbekannten Desoxyzuckers im LPS von Stämmen der O-Gruppen IV und VI blieb noch unbestimmt.

Ellwood und Kirk (4) untersuchten das LPS ihres nicht näher beschriebenen Y.ent.-Stammes durch Hydrolyse über 16 Stunden bei 100°C und trennten das Hydrolysat papierchromatographisch auf. Der weit vorauswandernde Zucker wurde durch Anfärben mit Vanillin-Perchlorsäure und p-Anisidin als 6-Desoxyhexose identifiziert. Dieser Zucker wurde isoliert, als Drehwinkel $\alpha = -16,2^\circ$ gemessen. Nach Freudenberg und Raschig (5) hat die 6-Desoxy-altrose einen Drehwinkel von $\alpha = -18^\circ$. Außerdem wurde der unbekannte Zucker papierchromatographisch mit Rhamnose, Fucose, 6-Desoxy-talose und 6-Desoxy-altrose verglichen. Er verhielt sich auch hier wie die 6-Desoxy-altrose.

Nach den bisher vorliegenden Untersuchungsergebnissen stellten sich für diese Arbeit zwei Aufgaben. Einmal war im Hinblick auf die Untersuchungsergebnisse von Ellwood und Kirk (4) die von Wartenberg und Mitarbeitern (20) bei Stämmen der O-Gruppe I noch nicht abschließend untersuchte 6-Desoxyhexose weiter zu analysieren. Außerdem galt es, die bisher noch nicht bekannte Desoxyhexose (2) des zur O-Gruppe VI gehörenden Stammes Ye 161 näher zu charakterisieren. Stämme dieser O-Gruppe, die beim Menschen bisher vor allem in den USA als Infektionserreger isoliert wurden, unterscheiden sich in verschiedenen kulturell-biochemischen Eigenschaften von Stämmen der O-Gruppe I (siehe Seite 2,11). Zur einwandfreien Identifizierung der Desoxyzucker wurden Gas- und Papierchromatogramme, Elektrogramme und Massenspektren angefertigt.

V Papier- und dünnschichtchromatographische Charakterisierung von 6-Desoxyhexosen

Kaufmann und Reichstein (8) untersuchten alle 8 möglichen isomeren 6-Desoxyhexosen. Die Formelbilder, Schmelzpunkte und Drehwinkel sind in nachfolgender Tabelle aufgeführt.

Tabelle 3

Charakterisierung von 6-Desoxyhexosen (nach Kaufmann und Reichstein)

$\text{HC}=\text{O}$  CH_3 6-Desoxy-D-allose $\text{F. } 140-143^\circ$ (± 0)	$\text{HC}=\text{O}$  CH_3 6-Desoxy-D-altrose amorph $(+16, 2)$	$\text{HC}=\text{O}$  CH_3 6-Desoxy-D-glucose $\text{F. } 139-140^\circ$ $(+29, 7)$	$\text{HC}=\text{O}$  CH_3 6-Desoxy-D-gulose $\text{F. } 130^\circ$ (-38)
$\text{HC}=\text{O}$  CH_3 6-Desoxy-L-galactose = Fucose $\text{F. } 140-145^\circ$ $(-76, 4)$	$\text{HC}=\text{O}$  CH_3 6-Desoxy-L-idose $\text{F. } 107-108^\circ$ (-26)	$\text{HC}=\text{O}$  CH_3 6-Desoxy-L-talose $\text{F. } 116-118^\circ$ (-20)	$\text{HC}=\text{O}$  CH_3 6-Desoxy-L-mannose = Rhamnose $\text{F. } 74-75^\circ$ $(+8, 5)$

Tabelle 4

Ergebnisse der Dünnschicht- und Papierchromatographie
(nach Kaufmann und Reichstein)

Zucker	DC R _{Rhamnose}	PC R _{Rhamnose}
6-Desoxy-D-allose	0,44	1,05
6-Desoxy-D-altrose	1,28	1,41
6-Desoxy-D-glucose	0,99	0,96
6-Desoxy-L-mannose	1,00	1,00
= L-Rhamnose		
6-Desoxy-D-gulose	0,43	1,06
6-Desoxy-D-idose	1,29	1,71
6-Desoxy-D-galactose	0,70	0,69
= D-Fucose		
6-Desoxy-L-talose	0,49	1,89

Diese Ergebnisse wurden zum Vergleich der eigenen Untersuchungsergebnisse herangezogen.

B) EXPERIMENTELLER TEIL

I Material und Methoden

1. Bakterienstämme

Untersucht wurden die innerhalb der O-Gruppe I zum Subtyp IA bzw. IB gehörenden Stämme Ye 75, Ye 160 bzw. Ye 62, Ye 39 und der zur O-Gruppe VI gehörende Stamm Ye 161 in Glatzform.

2. Gewinnung der LPS

Die zur LPS-Gewinnung benötigte Bakterienmasse kultivierten wir durch Überimpfen der einzelnen Stämme auf dem von Schlecht und Westphal (17) angegebenen Nährsubstrat mit folgender Zusammensetzung:

Fleischextrakt(Difco)	5.0 g
Tryptisch verdautes Casein (Brunnengräber)	15.0 g
Hefeextrakt(Difco)	5.0 g
Glucose(Merck)	3.0 g
NaCl	3.0 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	2.3 g
Agar-Agar(Difco)	15.0 g
H_2O (demineralisiert)	1.0 l
pH	7.3-7.4

Nach 24 Std. Bebrütung bei 30°C wurde der Kulturrasen von den Platten mit 1%igem Phenolwasser abgeschwemmt und die Bakteriensuspension anschließend über Nacht zur Abtötung der Keime bei 30°C im Brutschrank gehalten. Zum Trocknen versetzten wir die Suspension mit 96%igem Äthanol. Der abzentrifugierte Rückstand wurde mit Aceton und Äther gewaschen und die erhaltene Bakterienmasse im Exsikkator über konz. H_2SO_4 vom Äther befreit.

Extraktion der Bakterien mit homogener Phenol/ H_2O Mischung

Aus 30g Bakterien und 525ml H_2O stellten wir eine Suspension her und erwärmten auf 65-68°C. Unter ständigem Rühren wurde die gleiche Menge auf 65-68°C vorgewärmtes 90%iges Phenol zugegeben, weitere 5 min gerührt, im Eisbad abgekühlt und anschließend bei 3000 U/min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, die die Nucleinsäuren und LPS enthält, trenn-

ten wir ab und dialysierten 3 Tage in destilliertem Wasser. Anschließendes Liophilisieren ergab die Roh-LPS. Zur Reinigung der LPS von Nucleinsäuren zentrifugierten wir eine 3%-ige wässrige Lösung 3 mal in der Ultrazentrifuge 4 Std. bei 40 000 U/min. Die Nucleinsäuren bleiben dabei in den Überständen. Um die Reinheit der LPS zu prüfen, wurden Proben von 20mg LPS/ml H_2O photometrisch gemessen. Das Absorptionsmaximum der Nucleinsäuren liegt bei 258-260m μ .

3. LPS-Hydrolysen

Vollhydrolyse

10mg LPS wurden mit 2ml 0,5n H_2SO_4 24 Std. bei 100°C hydrolysiert, das Hydrolysat unter Nachspülen mit Wasser in ein Zentrifugenglas überführt und mit 200mg $BaCO_3$ versetzt. Nach etwa 1 Std., wenn die Probe neutral reagiert, gaben wir eine Spatelspitze Amberlite (Typ IRA-410) zu, zentrifugierten 15 min bei 3000 U/min und filtrierten den Überstand durch einen Glaswollepfropfen ab. Der Niederschlag wurde noch 2 mal mit je 2ml H_2O nachgewaschen, die vereinigten Überstände am Rotationsverdampfer im Vakuum (18mmHg) bei 50°C zur Trockene eingengt und in genau 0,5ml H_2O gelöst.

Teilhydrolyse

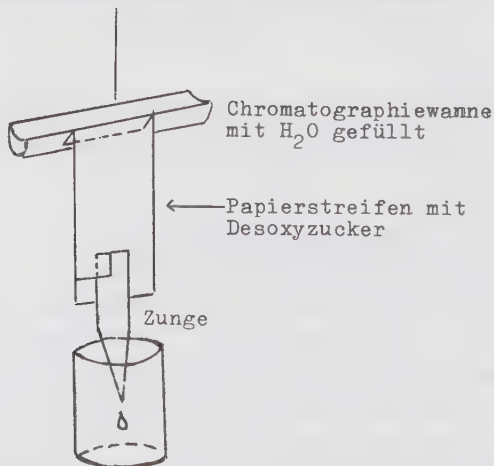
Zur Abspaltung der Seitenkettenzucker hydrolysierten wir die Probe nur 1 Std. bei 80°C. Die weitere Verarbeitung erfolgte wie oben.

4. Präparative Isolierung der 6-Desoxyzucker

620mg LPS lösten wir in 25 ml 0,5n H_2SO_4 + 10ml H_2O und hydrolysierten 3 Std. bei 100°C. Zur Neutralisation gaben wir der Lösung 5ml 2n NaOH, einige Tropfen 0,1n NaOH und 2 Spatelspitzen $BaCO_3$ zu. Das ausgefallene $BaSO_4$ wurde abzentrifugiert, der Überstand erst über eine mit Ionenaustauscherharz Amberlite Typ IRA-410, dann eine zweite mit Dowex 50 WX 2 gefüllte Säule (20x0,7cm) gereinigt. Die Lösung trockneten wir ein und versetzten mit 1,5ml H_2O . Die weitere Reinigung des Zuckers erfolgte durch präparative Papierchromatographie. Dazu wurde an einem Bogen Whatman Nr.3-Papier am

rechten und linken Rand ein 8cm breiter Streifen(=Vergleichsstreifen) abgezeichnet. Auf diesen Streifen wurden 9cm vom oberen Rand entfernt(=Start) $5\mu\text{l}$ des Hydrolysats aufgetragen, weitere 0,5ml der Zuckerlösung strichförmig mit Lineal und Pasteurpipette über die verbleibende Breite verteilt. Für 1,5ml Lösung präparierten wir auf diese Weise 3 Bogen Papier. Die Chromatogramme wurden 15 Std. mit Pyridin:Butanol: H_2O (40:60:30) als Fließmittel absteigend entwickelt, dann getrocknet, die Vergleichsstreifen abgetrennt und mit AgNO_3 -Lösung gefärbt. Im Abstand der angefärbten Flecken von der Startlinie wurde aus den ungefärbten Chromatogrammen ein 5cm breiter Streifen, der den Desoxyzucker enthält, ausgeschnitten, der Streifen am einen Ende etwas abgelenkt und zur Elution in eine mit Wasser gefüllte Chromatographiewanne eingehängt. Der Chromatographietrog war mit Wasserdampf gesättigt. Zum Eluieren verbrauchten wir etwa 150ml H_2O .

Abbildung 1
Schematische Darstellung der Elutionstechnik



Die erhaltene wässrige Zuckerlösung trockneten wir am Rotationsverdampfer im Vakuum(18mmHg) bei 50°C ein, lösten den Rückstand in 2ml absolutem Alkohol, kochten mit einer Spa-

telspitze Aktivkohle kurz auf und filtrierten durch ein Filter aus Papierbrei ab. Die Kohle wurde einige Male mit wenig absolutem Alkohol nachgewaschen, die klare Zuckerlösung wieder zur Trockene abgedampft, der Rückstand in 2ml Alkohol aufgenommen und in ein gewogenes Wägegläschen überführt. Im Exsikkator trockneten wir die Lösung über konz. H_2SO_4 ein und erhielten aus den anfangs eingesetzten 620mg LPS 80,5mg Desoxyzucker, das ist eine Ausbeute von 13% (bezogen auf LPS). Da die LPS rund 18% des Desoxyzuckers enthalten, betrug die auf den Zucker bezogene Ausbeute etwa 72%.

5. Analysenmethoden

Papierchromatographie

Wir arbeiteten nach der absteigenden Methode mit Whatman Nr.1-Papier und Butanol:Pyridin: H_2O wie 60:40:30 als Fließmittel. Die Laufzeit betrug 20 Std. Bei Vollhydrolysaten wurden Mengen von 30-60 μ l, bei Teilhydrolysaten 120-150 μ l der aufbereiteten Lösungen aufgetragen (Konzentration: 10mg LPS/0,5ml H_2O). Zum Vergleich diente ein Zuckergemisch von Glc, Gal, Man, Fuc und Rha mit je 1mg/ml H_2O . Die Auftragsmenge betrug jeweils 10 μ l.

Für den Vergleich der gefundenen Laufzeiten mit den Ergebnissen von Kaufmann und Reichstein (8) fertigten wir Papierchromatogramme wie folgt an:

Whatman Nr.1-Papier wurde durch ein Gemisch aus Aceton und H_2O (2:1) gezogen. Mit dem Auftragen der Proben warteten wir, bis das Papier nicht mehr nach Aceton roch. Die Vergleichszucker Rhamnose und Fucose wurden als 1%ige methanolische Lösungen in Mengen zu je 3 μ l aufgetragen, die Lösungen der Teilhydrolysate in Mengen zu je 30 μ l. Das Papier trockneten wir so lange an der Luft, bis sein H_2O -Gehalt genau 35% seines Trockengewichts entsprach. Dann wurde es in den Chromatographietrog eingehängt. Als Fließmittel diente ein mit Wasser gesättigtes Gemisch aus Toluol:Butanol (2:1). Wir ließen das Chromatogramm so lange laufen, bis das Fließmittel vom unteren Rand abtropfte. Entwickelt wurden alle Papierchromatogramme mit Silbernitrat-Lösung (19).

AgNO₃-Lösung:

2,2g AgNO₃ löst man in etwas H₂O und versetzt mit 200ml Aceton. Der dabei entstandene Niederschlag löst sich durch Zugabe von 4-5ml H₂O.

NaOH-Lösung:

4g NaOH werden in wenig H₂O gelöst und in 200ml Äthanol aufgenommen.

Thiosulfat-Lösung:

10g Na₂S₂O₃·5H₂O löst man in 40ml Äthanol.

Die Chromatogramme wurden nacheinander durch diese 3 Lösungen gezogen.

Dünnschichtchromatographie (8)

Dazu beschichteten wir Glasplatten mit Kieselgel G "Merck". Für 5 Platten (20x20cm) verwendeten wir 60g Kieselgel, verrührt mit 60ml H₂O und 60ml Methanol. Die fertigen Platten trockneten wir etwa 1/2 Std. an der Luft, aktivierten sie anschließend 1 Std. im Trockenschrank bei 120°C und bewahrten sie unter Feuchtigkeitsausschluß auf. Die Substanzen wurden 2cm vom unteren Rand entfernt aufgetragen in Mengen von 50µl. Für die Herstellung der Probelösungen wurden jeweils 50mg LPS hydrolysiert und nach Aufarbeitung (s.S.16) in 10ml CH₃OH gelöst. Die Laufstrecke der Lösungsmittelfront betrug 14cm, das entspricht einer Laufzeit von 55±5min. Als Fließmittel diente ein Gemisch aus Essigester:Isopropanol:Methanol wie 65:20:15. Zum Entwickeln besprühten wir die getrockneten Platten mit einer 20%igen Lösung von p-Toluolsulfonsäure in Alkohol und erhitzen kurze Zeit auf 120°C. Wir erhielten hellgelb gefärbte Flecken.

Gaschromatographie

Die LPS-Hydrolysate müssen für die gaschromatographische Analyse reduziert und acetyliert werden(16). Man erhält die leicht verdampfbaren Acetate der entsprechenden Zuckeralkohole (Al-ditole).

Wir hydrolysierten 10mg LPS und neutralisierten wie auf

Seite 16 beschrieben. Anschließend lösten wir die getrocknete Probe in 0,5ml H_2O , gaben 5mg $NaBH_4$ in 0,5ml 0,1n NaOH dazu und ließen die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen. Die reduzierte Lösung ließen wir über eine mit Ionenaustauscherharz (Dowex Typ 50 WX 2) gefüllte Säule (Länge 20cm, $\varnothing$ 0,7cm) laufen, spülten mit Wasser nach und engten am Rotationsverdampfer im Vakuum (18mmHg) bei $50^\circ C$ zur Trockene ein. Um die Borsäure zu entfernen wurde die Probe 4-5 mal mit je 1,5ml Methanol am Rotationsverdampfer abgedampft. Zur Acetylierung erhitzen wir nun die getrocknete Probe in einem geschlossenen Kölbchen mit 0,5ml Pyridin: Essigsäureanhydridgemisch (1:1) 30min im siedenden Wasserbad. Nach dem Abkühlen versetzten wir mit 1ml H_2O und engten am Rotationsverdampfer bis zur Trockene ein. Den Vorgang wiederholten wir, bis die Probe nicht mehr nach Pyridin und Essigsäure roch. Schließlich wurde der völlig trockene Rückstand in 0,4ml Chloroform aufgenommen.

Für die gaschromatographischen Analysen verwendeten wir ein Gerät der Firma Varian, Modell 2400.

Versuchsbedingungen:

Säule	: Länge 6ft, $\varnothing$ 1/8", gefüllt mit 3% ECNSS-M auf Gaschrom Q 100-200mesh
N_2 -Strom	: 30ml/min
Säulentemperatur	: 185°
Injektortemperatur	: 225°
FID-Temperatur	: 225°
Einspritzmenge	: 1 μ l von aufbereiteten Vollhydrolysaten 2 μ l von aufbereiteten Teilhydrolysaten

Massenspektrometrie

Die Massenspektren der acetylierten Alditole wurden mit dem Gerät MAT 111 der Firma Varian, Bremen, aufgenommen.

Papierelektrophorese

Die Elektrogramme fertigten wir mit einem Hochspannungsgerät der Firma Camag an.

Wir verwendeten einen Borax-NaOH-Puffer mit pH= $10,4 \pm 0,1$ (95,3g Borax und 20,2g NaOH auf 5l Lösung).

Aus Whatman Nr.1-Papier wurde ein 15cm breiter Streifen ge-

schnitten, durch die Pufferlösung gezogen und mit einer Gummiwalze abgepresst. Die Substanzlösungen trugen wir in Mengen von 20-50 μ l (10mg LPS/0,5ml Borax-NaOH-Puffer) auf. Die Spannung lag bei 3500V. Dabei ergab sich eine Stromstärke von 100mA. Als Laufzeit wählten wir 30min. Entwickelt wurde mit Silbernitratlösung.

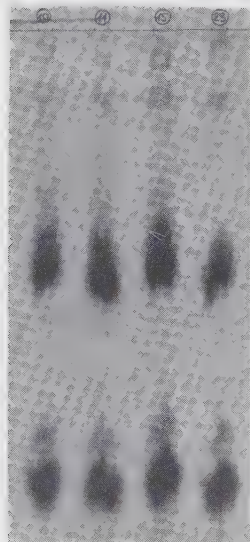
II Identifizierung des Desoxyzuckers verschiedener Stämme der O-Gruppe I (Ye 62, Ye 160, Ye 75, Ye 39)

1. Papier- und gaschromatographische Vergleiche der Lipopolysaccharid-Vollhydrolysate

Durch diese Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob alle 4 Stämme denselben unbekannten Zucker in ihrem LPS enthalten. Abbildung 2 zeigt ein Papierchromatogramm (PC) der LPS-Vollhydrolysate von Ye 62, Ye 160, Ye 75 und Ye 39.

Abbildung 2

Papierchromatogramm der LPS-Vollhydrolysate der Stämme Ye 62, Ye 160, Ye 75, Ye 39



Start

	Extraktion Nr.	Stamm Nr.
Gal	10	Ye 62
Glc	11	Ye 160
	15	Ye 75
	23	Ye 39

Rha

Desoxyzucker X

Die Laufstrecke des unbekannten Zuckers war, wie das Papierchromatogramm zeigt, bei allen 4 Stämmen gleich. Die Werte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5

Laufstrecken des Zuckers X der 4 untersuchten Y.ent.-Stämme

Stamm Nr.	Laufstrecke cm
Ye 62	31,0
Ye 160	31,5
Ye 75	30,5
Ye 39	31,0

Unmittelbar auf den unbekannten Zucker folgte im Papierchromatogramm die Rhamnose.

Im Gaschromatogramm (GC) wurden der Zucker "X" und die Rhamnose nicht getrennt, sie erscheinen als 1 Peak. Die zugehörigen Gaschromatogramme zeigen die Abbildungen 3-6.

Die Retentionszeiten des unbekannten Zuckers sind auch im Gaschromatogramm, wie Tabelle 6 zeigt, annähernd gleich.

Tabelle 6

Retentionszeit (tr) des Zuckers X der 4 untersuchten Y.ent.-Stämme

Stamm Nr.	tr sec
Ye 62	162
Ye 160	155
Ye 75	157
Ye 39	165

Aus den Versuchsergebnissen darf man schließen, daß die 4 Stämme denselben Zucker besitzen. Die relativ kleine Retentionszeit sprach für einen Desoxyzucker.



Abbildung 3
 GC des LPS von Stamm Ye 62
 (Vollhydrolysat)

Peak Nr.	Zucker	tr sec
1	DO-Zucker +Rhamnose	162
2	Gal	405
3	Glc	431
4	Hep I	604
5	Hep II	637

LM = Lösungsmittel

Abbildung 4
GC des LPS von Stamm Ye 160
 (Vollhydrolyse)

Peak Nr.	Zucker	tr sec
1	DO-Zucker + Rhamnose	155
2	Gal	409
3	Glc	435
4	Hep I	617
5	Hep II	654

LM = Lösungsmittel



Abbildung 5
 GC des LPS von Stamm Ye 75
 (Vollhydrolyse)



Peak Nr.	Zucker	tr sec
1	D0-Zucker + Rhamnose	157
2	Gal	417
3	Glc	444
4	Hep I	623
5	Hep II	658

LM = Lösungsmittel

Abbildung 6
GC des LPS von Stamm Ye 39
(Vollhydrolyse)

Peak Nr.	Zucker	tr sec
1	DO-Zucker + Rhamnose	165
2	Glc	447
3	Hep I	621
4	Hep II	655

LM = Lösungsmittel

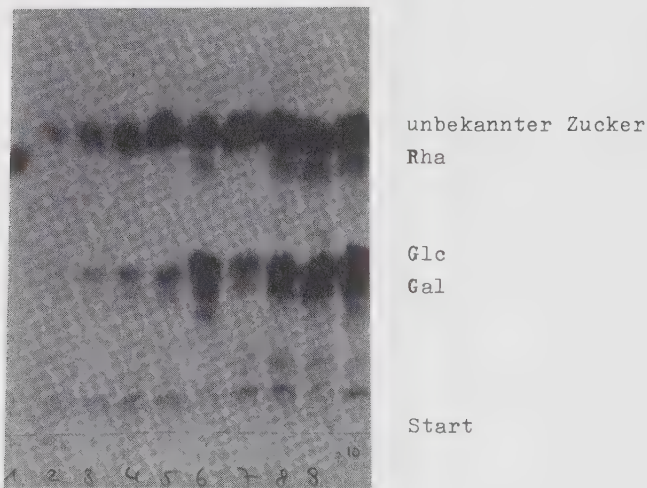


2. Papierchromatogramm der Stufenhydrolysate

Das LPS von Ye 160 wurde stufenweise hydrolysiert und von den Hydrolysaten ein Papierchromatogramm angefertigt. Abbildung 7 zeigt das Ergebnis.

Abbildung 7

Papierchromatogramm der Stufenhydrolysate des LPS von Stamm Ye 160



Proben Nr.	Hydrolysen- dauer min	Hydrolysen- temperatur Grad	Auftragsmenge μ l
1 = Rhamnose als Vergleichszucker			
2	15	80	120
3	30	80	120
4	60	80	120
5	120	80	120
6	15Std.	100	30
7	15	100	120
8	30	100	120
9	60	100	120
10	120	100	120

Der unbekannte Zucker wurde bereits nach kurzer Hydrolyse (Proben 2 u.3) aus dem LPS freigesetzt. Wir schlossen da-

raus, daß er in der Seitenkette des LPS lokalisiert ist. Die Laufgeschwindigkeit des Zuckers war wenig größer als die der Rhamnose. Abbildung 7 zeigt eindeutig, wie bei zunehmender Hydrolysendauer die übrigen Zucker Rhamnose, Glucose und Galactose freigesetzt werden.

3. Massenspektrogramme

Den Beweis, daß es sich tatsächlich um einen Desoxyzucker, und zwar um eine 6-Desoxyhexose handelt, lieferte das Massenspektrogramm.

Abbildung 8 zeigt das Massenspektrum von Rhamnose und Abbildung 9 das des Desoxyzuckers des LPS von Stamm Ye 160. Man erkennt vor allem in den für 6-Desoxyzucker charakteristischen Peaks 99, 117, 129, 159, 201 und 231, daß die Spektrogramme identisch sind.

Abbildung 8
Massenspektrum von Rhamnose

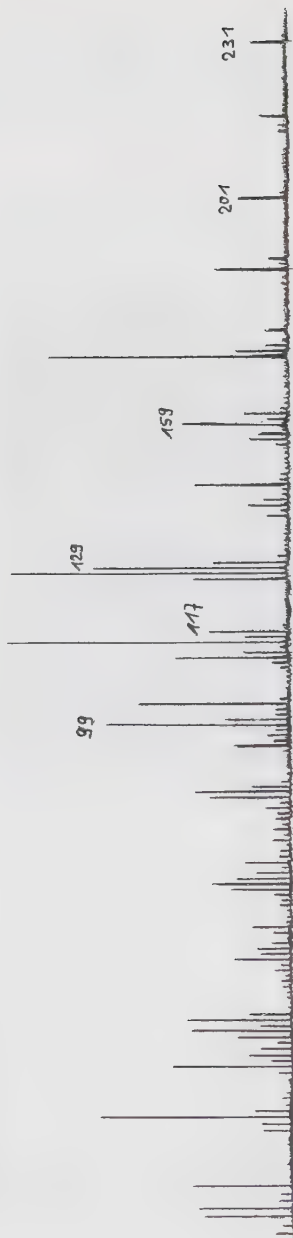
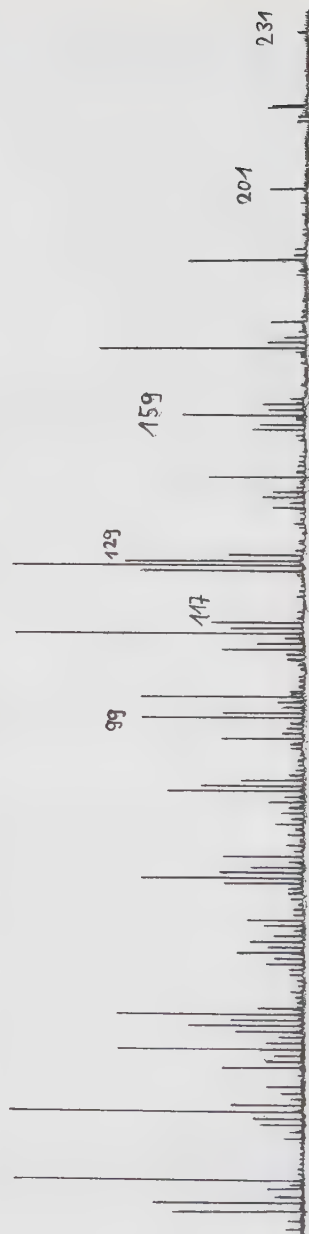


Abbildung 9
Massenspektrum des Desoxyzuckers des IPS von Stamm Ye 160



4. Gas- und Papierchromatogramme zum Ausschluß von Rhamnose und Fucose

Den Beweis, daß der noch nicht bekannte 6-Desoxyzucker weder mit Rhamnose noch mit Fucose identisch ist, suchten wir mit Hilfe der Gas- und Papierchromatographie zu erbringen. Für die gaschromatographische Untersuchung wurde dem Teilmhydrolysat des LPS von Stamm Ye 39 Rhamnose bzw. Fucose zugesetzt. Die zugehörigen Chromatogramme zeigen die Abbildungen 10-14.

Die Retentionszeiten (tr) liegen, wie aus den Gaschromatogrammen ersichtlich, für Rhamnose bei 361 bzw. 365, für Fucose bei 402 bzw. 406 und für Desoxyhexose "X" bei 372, 379 bzw. 384 Sekunden. Nach diesen Ergebnissen kann die Desoxyhexose "X" weder mit Rhamnose noch mit Fucose identisch sein.

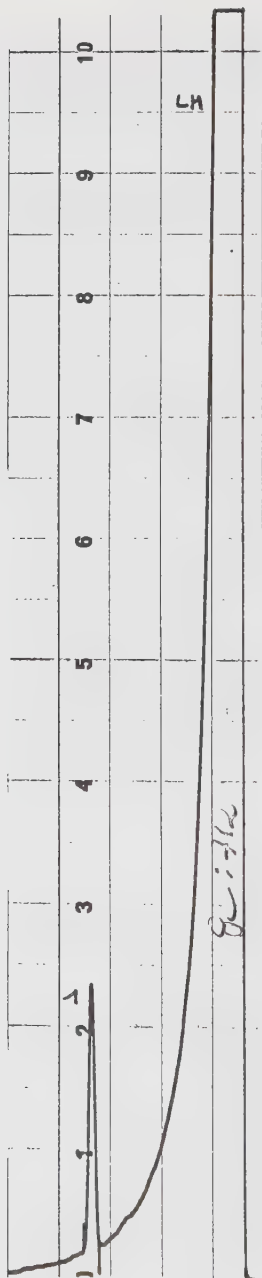


Abbildung 10
GC von Rhamnose

LM = Lösungsmittel
 1 = Rhamnose

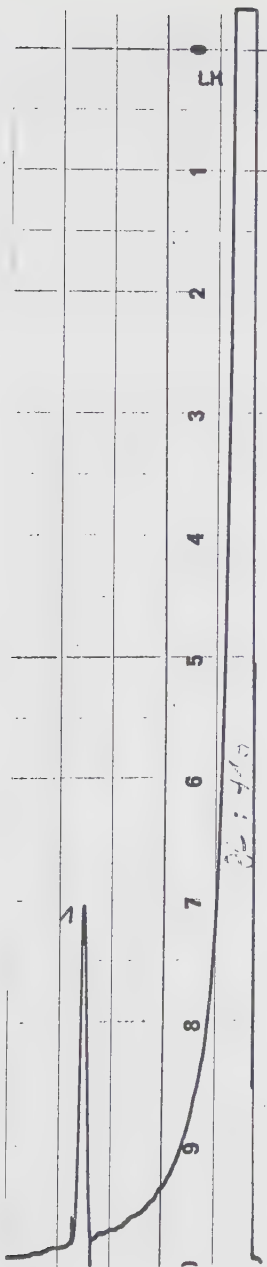


Abbildung 11
GC von Fucose

LM = Lösungsmittel
 1 = Fucose

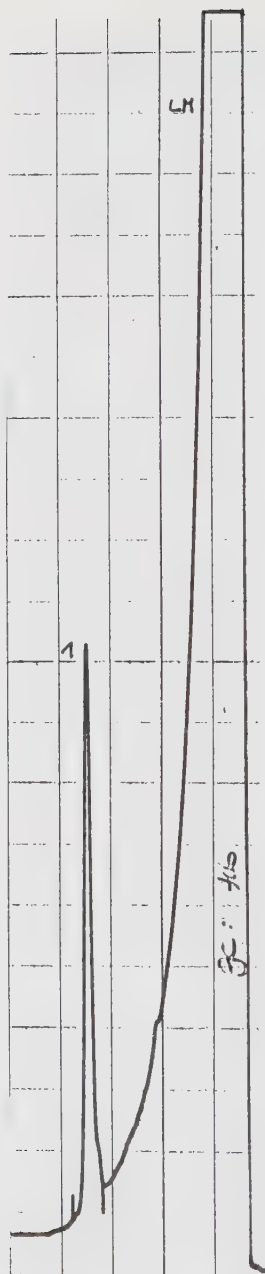


Abbildung 12

GC von Desoxyhexose X

LM = Lösungsmittel

1 = Desoxyhexose X

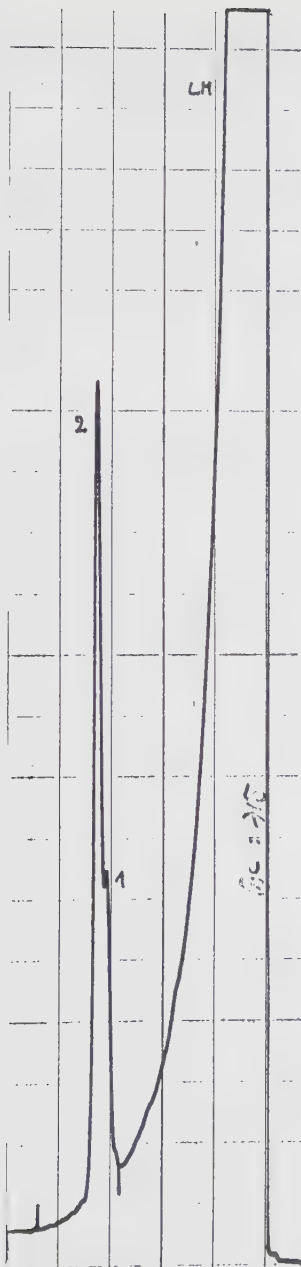


Abbildung 13

GC von Desoxyhexose X

+ Fucose

LM = Lösungsmittel

1 = Desoxyhexose X

2 = Fucose

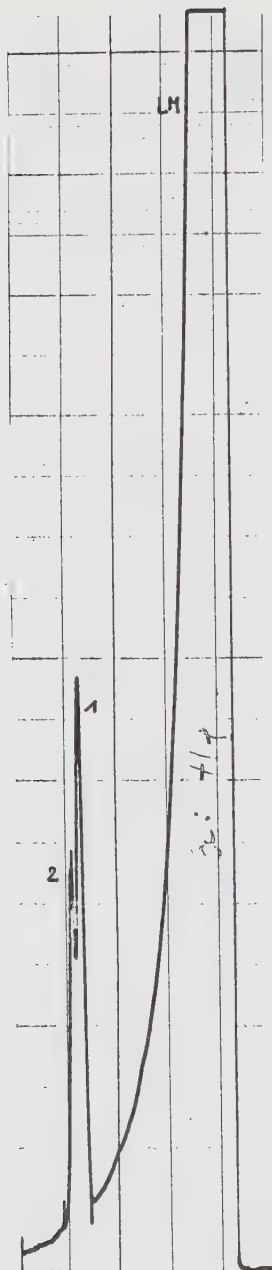
Abbildung 14

GC von Desoxyhexose X
+ Rhamnose

LM = Lösungsmittel

1 = Rhamnose

2 = Desoxyhexose X



Wie die vorstehenden Gaschromatogramme leicht erkennen lassen, erhält man bei Zusatz von Rhamnose und Fucose jeweils 2 getrennte Peaks, d.h. die 6-Desoxyhexose "X" ist nicht mit diesen Zuckern identisch.

Der Nachweis, daß es sich bei dem unbekannten Desoxyzucker nicht um Rhamnose oder Fucose handelt, gelang auch im Papierchromatogramm. Die Abbildungen 15 und 16 zeigen deutlich die unterschiedlichen Laufstrecken der drei Zucker. Die Reihenfolge der Zucker vom Start aus ist Gal-Glc-Man-Fuc-Rha-Desoxyhexose X.

Tabelle 8

Laufstrecken von Rhamnose, Fucose und Desoxyhexose X
im Papierchromatogramm

Zucker	Laufstrecke cm
Desoxyhexose X	30,5
Rhamnose	27
Fucose	22,5

Abbildung 15

Papierchromatogramm der Vollhydrolysate des LPS der 4
untersuchten Stämme neben einem Zuckertestgemisch



Start

Gal

Glc

Man

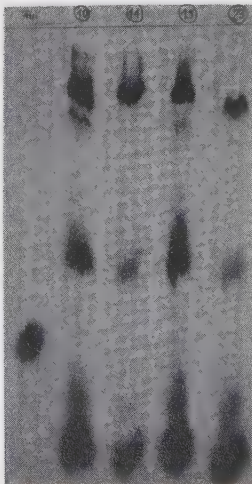
Fuc

Rha

Desoxyhexose X

Abbildung 16

Papierchromatogramm der Teilhydrolysate des LPS der 4
untersuchten Stämme neben Fucose



Start

Gal

Glc

Fuc

Rha

Desoxyhexose X

5. Papier- und dünnschichtchromatographische Bestimmung der Laufstrecke des isolierten Desoxyzuckers

Um festzustellen, welche der isomeren 6-Desoxyhexosen das LPS der Stämme Ye 62, Ye 160, Ye 75 und Ye 39 enthält, versuchten wir, die Ergebnisse von Kaufmann und Reichstein zu reproduzieren (s.S. 13). Dazu wurden Papier- und Dünnschichtchromatogramme wie auf Seite 18 und 19 beschrieben, hergestellt. Die Laufstrecke der Rhamnose wurde gleich 1 gesetzt, die übrigen Werte darauf bezogen. Aus jeweils 7 Messungen erhielten wir folgende Mittelwerte:

<u>Zucker</u>	<u>DC</u>	<u>PC</u>
6-Desoxyhexose aus Ye 62, 160, 75, 39	1,12	1,44
Fucose	0,77	0,68

Als Maß für die Reproduzierbarkeit der Methode testeten wir die Chromatogramme jeweils mit Fucose. Vergleicht man die Werte mit denen von Kaufmann und Reichstein (Tabelle 4, Seite 13), so erkennt man, daß der papierchromatographisch gefundene Wert mit dem der 6-Desoxy-altrose (1,41) gut übereinstimmt. Der auf dem Dünnschichtchromatogramm ermittelte Wert von 1,12 liegt etwas zu tief (6-Desoxy-altrose 1,28). Das unterschiedliche Ergebnis dürfte auf die schlechte Reproduzierbarkeit der Methode zurückzuführen sein. 6-Desoxyglucose und 6-Desoxy-idose, deren Werte ebenfalls in der Nähe des gefundenen Wertes liegen (0,99 und 1,29) scheiden aus, da sie im Papierchromatogramm wesentlich kürzere bzw. längere Laufstrecken zurücklegen (0,96 und 1,71). Als 6-Desoxyhexose im LPS der 4 untersuchten Stämme kommt nach diesen Ergebnissen nur die 6-Desoxy-altrose in Frage.

6. Messung des Drehwinkels

Die aus Stamm Ye 75 durch Extraktion gewonnenen 80,5mg Desoxyzucker wurden in 1,5ml H_2O gelöst und die Drehung im Polarimeter gemessen. Wir erhielten einen Drehwinkel von $\alpha = -14,5^\circ$. Der Drehwinkel der 6-Desoxy-altrose beträgt nach Reichstein $\alpha = +16,2^\circ$ (Tab. 3), nach Kirk $\alpha = -16,1 \pm 2^\circ$ (4).

Kaufmann und Reichstein erhielten die 6-Desoxy-altrose nur als amorphe Substanz. Auch unsere Versuche, den extrahierten Desoxyzucker kristallin zu erhalten, mißlangen.

III Identifizierung des Desoxyzuckers von Stamm Ye 161(O-Gr.VI)

Die Identifizierung dieses Zuckers wurde in der gleichen Weise wie für die Zucker der Y.ent.-Stämme der O-Gruppe I angegeben, durchgeführt, so daß sich erneute Angaben zur Methodik erübrigen.

1. Gaschromatogramm des Vollhydrolysats

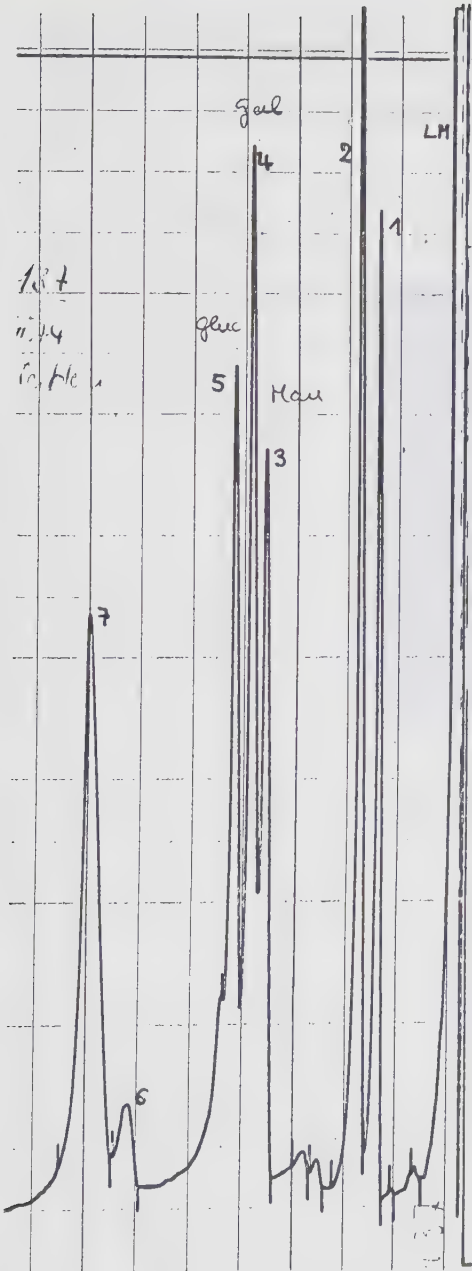
Der unbekannte Zucker "X" im LPS des Stammes Ye 161 zeigt ebenfalls eine kleine Retentionszeit. Man darf daher annehmen, daß es sich hier wie bei dem Zucker der Stämme der O-Gruppe I um einen Desoxyzucker handelt.

Abbildung 17 zeigt das Gaschromatogramm des Vollhydrolysats vom LPS des Stammes Ye 161.

Abbildung 17
GC des LPS von Stamm Ye161
(Vollhydrolysat)

Peak Nr.	Zucker	tr sec
1	Fuc	193
2	DO-Zucker X	235
3	Man	459
4	Gal	493
5	Glc	504
6	Hep I	744
7	Hep II	840

LM = Lösungsmittel

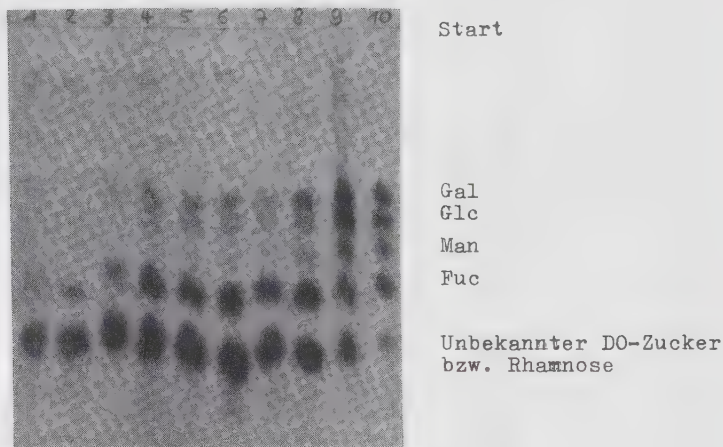


2. Papierchromatogramm der Stufenhydrolysate

Um festzustellen, ob es sich bei dem unbekannten Zucker "X" um ein Bestandteil des Core oder der Seitenketten handelt, wurde das LPS stufenweise hydrolysiert.

Abbildung 18

Papierchromatogramm der Stufenhydrolysate des LPS von Stamm Ye 161



Proben Nr.	Hydrolysen- dauer min	Hydrolysen- temperatur Grad	Auftragmenge µl
1	15	80	120
2	30	80	120
3	60	80	120
4	120	80	120
5	15	100	120
6	30	100	120
7	60	100	120
8	120	100	120
9	15Std.	100	30
10 = Zuckergemisch(Glc,Gal,Man,Fuc,Rha) je 10			

Die Reihenfolge der Zucker im Testgemisch vom Start aus ist
Gal-Glc-Man-Fuc-Rha.

Fucose und der unbekannte Zucker "X", der im Papierchromatogramm die gleiche Laufstrecke wie Rhamnose hat, wurden bereits nach 15-30 min Hydrolysendauer aus dem LPS freigesetzt (Proben 1 u.2), sie müssten somit in der Seitenkette lokalisiert sein.

3. Massenspektrogramm

Auch hier lieferte das Massenspektrogramm den Beweis, daß es sich um einen Desoxyzucker, nämlich eine 6-Desoxyhexose, handelt. Abbildung 19 zeigt das Spektrum von Rhamnose, Abbildung 20 das des Desoxyzuckers aus dem LPS von Stamm Ye 161. Die Spektrogramme stimmen in den charakteristischen Peaks 99, 117, 129, 159, 201 und 231 überein.

Abbildung 19
Massenspektrum von Rhamnose

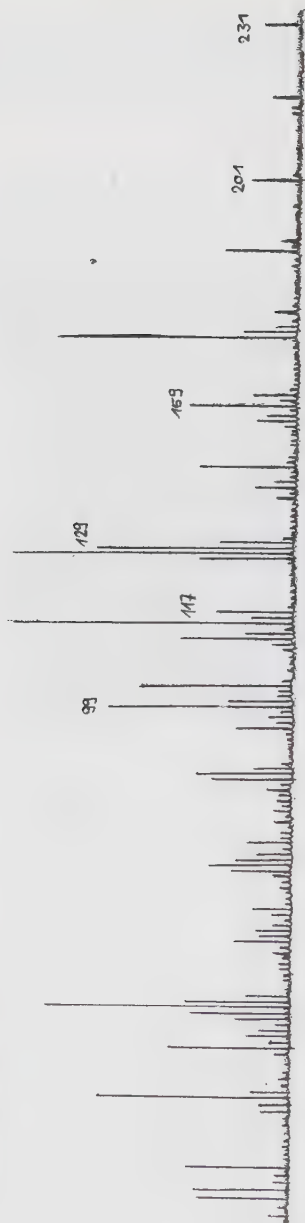
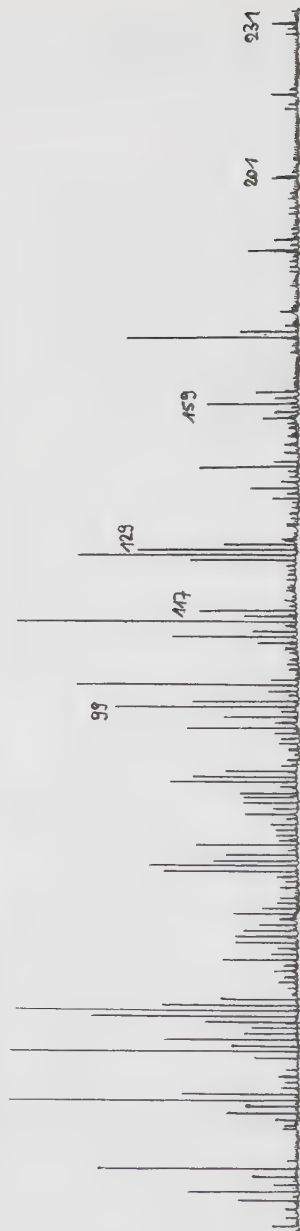


Abbildung 20
Massenspektrum des Desoxyzyuckers des LPS von Stamm Ye 161



4. Gas- und Papierchromatogramme zum Ausschluß von Rhamnose und Fucose

Mit Hilfe der Gaschromatographie konnten wir beweisen, daß die 6-Desoxyhexose weder mit Fucose noch mit Rhamnose identisch ist.

Bei Zusatz von Rhamnose bzw. Fucose zum Teilhydrolysat des LPS von Stamm Ye 161 erhält man die Chromatogramme, die in Abbildung 21 und 22 dargestellt sind.

In Abbildung 21 erkennt man deutlich den dritten zusätzlichen Peak, der der Rhamnose entspricht.

Bei Zusatz von Fucose (Abb. 22) wird der ursprünglich schon vorhandene Peak der Fucose stark vergrößert, der Desoxyzucker erscheint als zweiter davon getrennter Peak.

Papierchromatographisch konnten wir nur nachweisen, daß die Desoxyhexose im LPS von Stamm Ye 161 nicht mit Fucose identisch ist. Der Ausschluß von Rhamnose ist mit dieser Methode nicht möglich, da der Desoxyzucker "X" und die Rhamnose die gleiche Laufstrecke zurücklegen (Abb. 23 u. 24)

Die Reihenfolge der Zucker vom Start aus ist : Gal-Glc-Man-Fuc-Rha, Desoxyhexose X.

Abbildung 21
GC des LPS (Teilhydrolysat)
von Stamm Ye 161 + Rhamnose

Peak Nr.	Zucker	tr sec
1	Rha	475
2	Fuc	516
3	DO-Hexose X	672

LM = Lösungsmittel

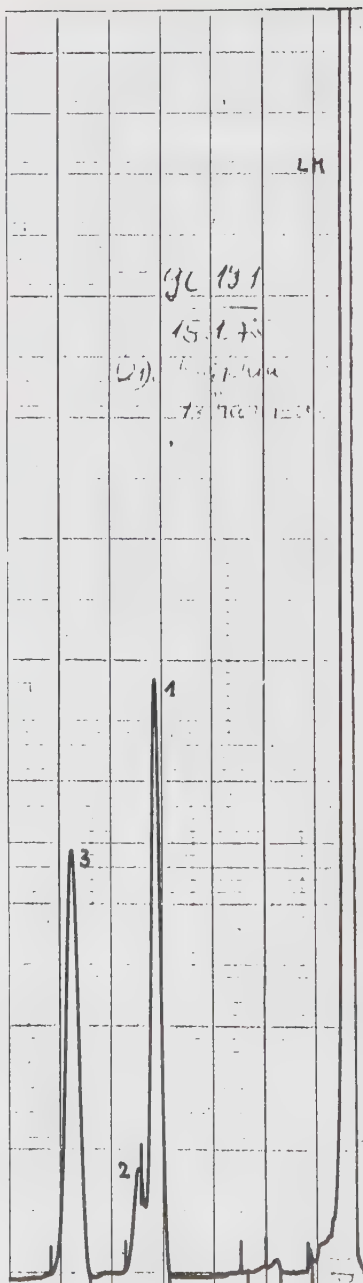


Abbildung 22
GC des LPS (Teilhydrolysat)
von Stamm Ye 161 + Fucose

Peak Nr.	Zucker	tr sec
1	Fuc	498
2	DO-Hexose X	648

LM = Lösungsmittel

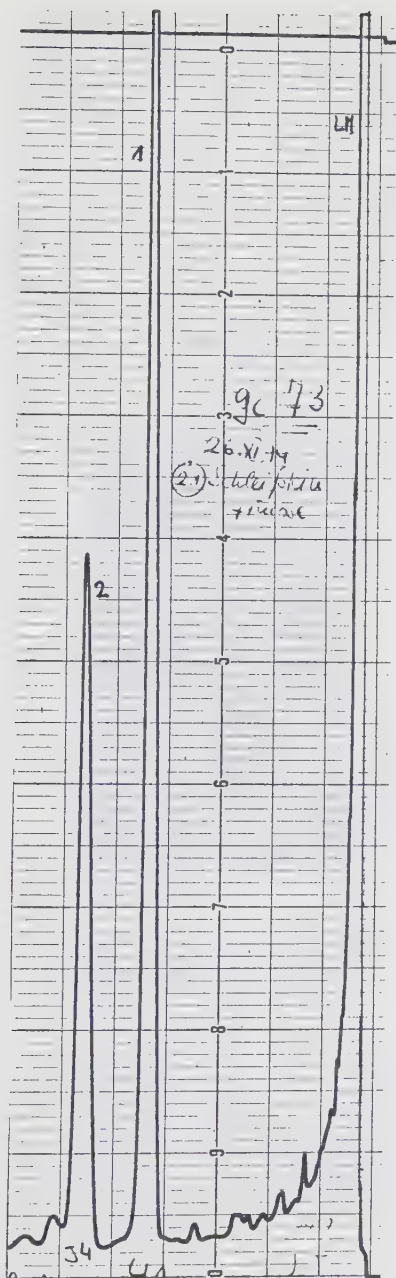
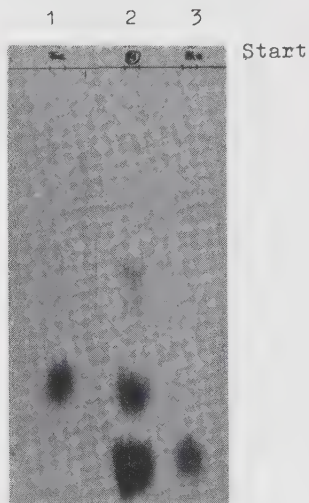


Abbildung 23

Papierchromatogramm des LPS-Teilhydrolysats von Stamm Ye 161
neben Rhamnose und Fucose



- 1 = Fucose
- 2 = LPS-Teilhydrolysat
von Stamm Ye 161
- 3 = Rhamnose

Abbildung 24

Papierchromatogramm des LPS-Vollhydrolysats von Stamm Ye 161
und eines Zuckerleestgemischs



- 1 = LPS-Vollhydrolysat
von Stamm Ye 161
- 2 = Zuckergemisch:
Glc, Gal, Man, Fuc, Rha

Gal
Glc
Man
Fuc

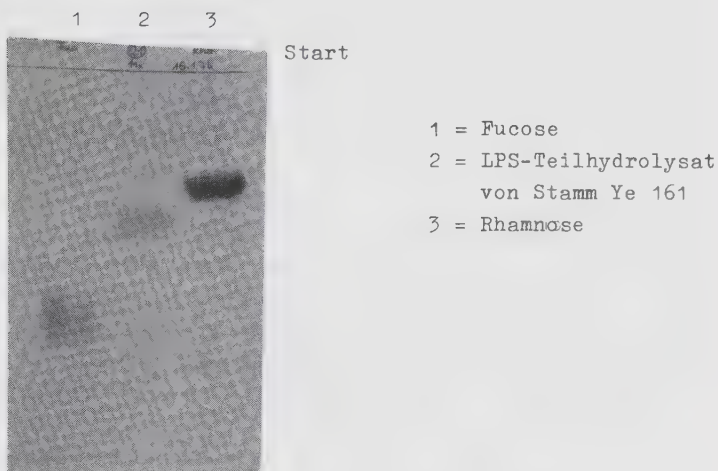
Rha bzw. Desoxyhexose "X"

5. Elektrophorese

Der Nachweis, daß die Desoxyhexose "X" im LPS von Stamm Ye 161 weder mit Rhamnose noch mit Fucose identisch ist, gelang uns auch mit Hilfe der Papierelektrophorese. Die drei zu vergleichenden Zucker legten deutlich verschiedene Laufstrecken zurück, wie Abbildung 25 zeigt.

Abbildung 25

Papierelektrogramm des LPS-Teilhydrolysats von Stamm Ye 161, Rhamnose und Fucose



Die Fucose aus dem LPS-Teilhydrolysat von Stamm Ye 161 war auf dem frischen Elektrogramm deutlich zu sehen, der Fleck war aber nicht beständig.

6. Papier- und dünnschichtchromatographischer Vergleich der Laufstrecken des aus Stamm Ye 161 isolierten Desoxyzuckers

Nach dem eindeutigen Ausschluß von Rhamnose und Fucose versuchten wir, den unbekannten Desoxyzucker im LPS von Stamm Ye 161 zu identifizieren. Wie bereits für die Stämmeder Gruppen

IA u. IB wurden Papier- und Dünnschichtchromatogramme nach den Angaben von Kaufmann und Reichstein angefertigt. Als Mittelwert aus 7 Messungen erhielten wir folgende Ergebnisse:

	DC	PC
Fucose	0,77	0,68
unbekannter DO-Zucker	0,85	1,05

Vergleicht man mit den Werten von Kaufmann und Reichstein (siehe Tab.4) so kommen nach den Ergebnissen der Papierchromatographie als zweiter Desoxyzucker im LPS von Stamm Ye 161 6-Desoxy-allose(1,05), 6-Desoxy-glucose(0,96) und 6-Desoxy-gulose(1,06) in Frage. Die 6-Desoxy-allose und 6-Desoxy-gulose legen im Dünnschichtchromatogramm jedoch wesentlich kürzere Laufstrecken zurück(0,44 und 0,43) als die 6-Desoxyhexose "X" aus Ye 161 und scheiden daher aus. Für die 6-Desoxy-glucose geben Kaufmann und Reichstein 0,99 an.

7. Messung des Drehwinkels

Um das oben erhaltene Ergebnis zu bestätigen, wurde der Drehwinkel des Desoxyzuckers festgestellt. 24,6mg extrahierter Desoxyzucker wurden in 0,9ml H₂O gelöst und im Polarimeter gemessen. Wir erhielten einen Winkel von $\alpha = -30,9^\circ$. Nach Reichstein hat die 6-Desoxy-D-glucose $\alpha = 29,7^\circ$. Die Werte stimmen im Rahmen der Meßgenauigkeit recht gut überein. Damit dürfte bewiesen sein, daß es sich bei dem Desoxyzucker im LPS von Stamm Ye 161 um die L-Form der 6-Desoxy-glucose handelt. Dieser Zucker wurde bisher in Bakterien noch nicht gefunden.

C. Diskussion

Durch unsere Untersuchungen konnten wir nachweisen, daß es sich bei dem Desoxyzucker in den Stämmen Ye 75, Ye 160, Ye 39 und Ye 62 (O-Gruppe I) um die 6-Desoxy-altrose handelt. Damit wurde das Ergebnis von Ellwood und Kirk (4), die diesen Zucker im LPS eines Yersinia-Stammes zuerst gefunden haben, bestätigt. In ihrer Arbeit fehlen aber nähere Angaben über die kulturell-biochemischen und serologischen Eigenschaften des untersuchten Stammes. Auch Beer und Seltmann (2) deuten die im LPS der Y.ent.-Stämme der O-Gruppen IA und IB gefundene Desoxyhexose als 6-Desoxy-altrose. Wahrscheinlich handelt es sich dabei um einen speziellen Zucker im LPS von Y.ent., der für Stämme der O-Gruppe I spezifisch ist. Im Gegensatz zu Beer und Seltmann konnten auch wir, wie Wartenberg und Mit. (20) in allen LPS-Hydrolysaten der oben genannten 4 Stämme geringe Mengen von Rhamnose nachweisen. Auch die 6-Desoxy-glucose wurde unseres Wissens bisher in Bakterien nicht gefunden. Daß sie in der Seitenkette des LPS von Stamm Ye 161 (O-Gruppe VI) lokalisiert ist, beweist ihre Freisetzung nach kurzer Hydrolysendauer. Offensichtlich handelt es sich bei der 6-Desoxy-glucose um den determinanten Zucker bei Stämmen der O-Gruppe VI. Diese Aussage bedarf aber der Bestätigung durch gleiche Untersuchungsergebnisse bei weiteren Stämmen von Y.ent. der O-Gruppe VI.

Literaturverzeichnis

- 1) "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8. Edition (1974) 330-332
- 2) Beer W. u. G. Seltmann: Studies on Immunochemistry of the O-Antigens from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. J. Hyg., Epidemiol., Microbiol. and Immunol. 18 (1974) 432-438
- 3) Edstrom R.D. u. E.C. Heath: Isolation of Colitose-containing Oligosaccharides from the Cell Wall-Lipopolysaccharide of *E. coli*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 21 (1965) 638-643
- 4) Ellwood D.C. u. G.R.A. Kirk: The Occurrence of 6-Desoxy-al-trose in the Lipopolysaccharide of *Yersinia enterocolitica*. Biochem. J. 122 (1971) 147-148
- 5) Freudenberg K. u. K. Raschig: Zur Kenntnis der Aceton-Zucker: L-Altromethylose, Chinovose und Digitoxose. Chem. Berichte 62 (1929) 373-383
- 6) Hurvell B. u. A. Lindberg: Serological Cross-Reactions between different *Brucella*-Species and *Yersinia enterocolitica*. Acta path. microbiol. scand. 81 (1973) 113-119
- 7) Kaufmann F.: "Classification of Bacteria", Munksgaard Verlag (1975) 64-114
- 8) Kaufmann H. u. T. Reichstein: Differenzierung sämtlicher raum-isomerer 6-Desoxyhexosen, 3-O-Methyldesoxyhexosen und 6-Des-oxyhexulosen. Helv. Chem. Acta 50 (1967) 239-240
- 9) Knapp W., J. Lysy, Ch. Knapp, W. Stille u. U. Goll: Enterale Infek-tion beim Menschen durch *Yersinia enterocolitica* und ihre Diagnose. Infektion 2 (1973) 113-125
- 10) Knapp W. u. H.H. Mollaret: International Committee on systema-tical Bacteriology. Subcommittee on the Taxonomy of Pasteu-rella, *Yersinia* and *Francisella*. (I.C.S.B.) Malmö (1972) Int. J. Syst. Bacteriol. 22 (1972) 401
- 11) Knapp W. u. E. Thal: Die biochemische Charakterisierung von *Yersinia enterocolitica* als Grundlage eines vereinfachten Antigen-schemas. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 223 (1973) 88-105
- 12) Lüderitz O.: Neuere Ergebnisse zur Biochemie der Zellwand-Lipopolysaccharide von *Salmonella*-Bakterien.

Angew.Chemie 18(1970) 708-722

- 13) Lüderitz O., F.Kaufmann, H.Stierlein u.O.Westphal: Zur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 178(1960) 442-458
- 14) Lüderitz O.u.O.Westphal: 3,6-Didesoxyhexosen; Chemie und Biologie. Angew. Chemie 72(1960) 881-891
- 15) Niléhn B.: Studies on *Yersinia enterocolitica* (with special reference to bacterial diagnosis and occurrence in human acute disease) Acta path.microbiol.scand.suppl. 206(1969) 1-48
- 16) Savardeker J.S., J.H.Sloneker u.A.R.Jeanes: Quantitative Determination of Monosaccharides as their Alditol Acetates by Gas Liquid Chromatography. Analyt.Chemistry 37(1965) 602-1604
- 17) Schlecht S.u.O.Westphal: Wachstum und Lipopolysaccharidgehalt von Salmonellen bei Züchtung auf Agar-Nährböden.
Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 200(1960) 241-259
- 18) Seltmann G.: Untersuchungen zur Antigenstruktur von Shigellen. Ztschr.allg.Mikrobiol. 12(1972) 497-520
- 19) Trevelyan W.E., D.P.Procter u.J.S.Harrison: Detection of Sugars on Paper Chromatograms. Nature(London) 166(1950) 444-446
- 20) Wartenberg K., J.Lysy u.W.Knapp: Über die Zuckerzusammensetzung der Lipopolysaccharide verschiedener als *Yersinia enterocolitica* bezeichneter Stämme. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt. Orig.A 230(1975) 361-366
- 21) Wauters G.: Contribution à l'étude de *Yersinia enterocolitica*. These d'agrégation, Louvain 1970 pp1-105
- 22) Wauters G., L.LeMinor et A.M.Chalon: Antigènes somatiques et flagellaires des *Yersinia enterocolitica*. Ann.Inst.Pasteur 120 (1971) 631-642
- 23) Westphal O.u.O.Lüderitz: Erforschung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien. Angew.Chemie 66 (1954) 407-417
- 24) Westphal O., O.Lüderitz u.F.Bister: Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z.Naturforschung 7b (1952) 148-155

- 25) Westphal O., O.Lüderitz, H.Nikaido u.A.M.Staub: Isolation and Chemical and Immunological Characterisation of Bacterial Lipopolysaccharides. "Microbial Toxins" IV (1971) 145-233
- 26) Westphal O., O.Lüderitz, A.M.Staub u.R.Tinella: Vorkommen und immunologische Differenzierung zweier optischer Antipoden als determinante Endgruppe in Salmonella O-Antigenen. Zbl.Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.A 174 (1959) 307-314
- 27) Winblad S.: Studies on O-antigen Factors of Yersinia enterocolitica. Symp.Series Immunobiol.Stand. 9 (1968) 337-343

Lebenslauf

Am 10. Juni 1951 wurde ich als Tochter des Schlossers Konrad Heinz und dessen Ehefrau Erna in Nürnberg geboren. Im September 1957 trat ich in die Grundschule in Nürnberg ein, im September 1961 wechselte ich in das Sigena-Gymnasium Nürnberg über, wo ich im Mai 1970 das Abitur bestand. Im Oktober 1970 begann ich das Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen. Dort legte ich im April 1973 das Physikum und im Juli 1976 das Staatsexamen ab.

Erlangen, im August 1976

Ingrid Margarete Heinz

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990